



TITLE:

Involvement of urinary bladder Connexin43 and the circadian clock in coordination of diurnal micturition rhythm(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Negoro, Hiromitsu

CITATION:

Negoro, Hiromitsu. Involvement of urinary bladder Connexin43 and the circadian clock in coordination of diurnal micturition rhythm. 京都大学, 2013, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2013-07-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k17826>

RIGHT:

京都大学	博士（ 医 学）	氏 名	根来 宏光
論文題目	Involvement of urinary bladder Connexin43 and the circadian clock in coordination of diurnal micturition rhythm (膀胱のコネキシン43と概日時計は日内排尿リズムに関与している)		
(論文内容の要旨)			
<p>【目的】哺乳類は、覚醒期よりも睡眠期に尿の産生量が減り、機能的膀胱容量が増大する日内リズムを有するが、その形成機序は未知であった。一方、時計遺伝子群が形成する概日時計と、内分泌や睡眠覚醒などの生理機能や、癌、高血圧、うつ病などの疾患への関与が解明されつつあるが、膀胱では未知である。膀胱過活動の一因に、膀胱のギャップジャンクション(GJ)構成タンパクであるコネキシン 43(Cx43)の発現上昇を認め、本研究では、この Cx43 に着目し時計遺伝子と日内排尿リズムとの関連を検討した。</p> <p>【方法】 (1)自動巻き取り型濾紙を使用した独自のマウス排尿解析装置を開発し、自由行動下の雌 Cx43+/-マウスとその同腹雌野生型 (WT) マウスの排尿行動解析を行った。(2)雌WTマウスおよびラット膀胱における Cx43 と時計遺伝子の概日発現リズムをリアルタイムPCR法にて、Cx43 タンパクの発現をウエスタンブロッティング法にて検討し、排尿行動解析と比較対照した。(3)概日時計の機能がほぼ完全に破綻している Cry-nullマウスの排尿行動解析を行った。(4)時計遺伝子 Per2 とLuciferaseの結合蛋白を発現する Per2Luciferaseマウスの膀胱を体外培養し、その発光を経時的に測定した。膀胱平滑筋培養細胞を50%血清で刺激し細胞の時計を同調させ、時計遺伝子とCx43 のmRNAとタンパクの発現を検討し、GJの機能変動をDye-transferで測定した。(5)マイクロアレイ法にてマウスの膀胱で日内変動する遺伝子を網羅的に解析した。(6) 種々の時計遺伝子を強制発現させスクリーニングすることで、Cx43の転写を制御する時計遺伝子の候補を同定し、siRNA法、プロモーターレポーターアッセイ法、共免疫沈降法、クロマチン免疫沈降法にてそのメカニズムを解析した。</p> <p>【結果】 (1)Cx43+/-マウスは、同腹WTマウスと比較し膀胱のCx43 の発現量が約40%に低下し、一回排尿量が有意に増大していた。(2) WTマウスやラットでは一回排尿量は覚醒期に減少し、睡眠期に増大する有意な日内変動を示した。膀胱における Cx43mRNA発現は時計遺伝子群とともに明確な日内変動を示し、Cx43 タンパクレベルは覚醒期中期で最高に、睡眠期中期で最低となった。(1)(2)よりCx43 の発現量が一回排尿量と逆相関することが示されCx43は機能的膀胱容量の調節分子と考えられた。(3)Cry-nullマウスでは膀胱の Cx43、Per2、Bmal1 のmRNAの発現リズムと日内排尿リズムが消失していた。(4)Per2Luciferaseマウスの膀胱の発光は概日リズムを刻んだ。膀胱平滑筋細胞は時計遺伝子時計遺伝子、Cx43 の発現に日内変動を示し、それはGJ によるDyeの伝播度と相関した。時計遺伝子、Cx43 とその機能は膀胱で内在性リズムを有することが示された。(5)マイクロアレイにて184の有意に日内変動する遺伝子が膀胱に存在し、Cx43はその上位にあった。(6)恒常的な転写抑制因子として知られていたRev-erbαがCx43 の転写を逆に活性化した。Cx43 プロモーター上のSp1領域で、転写因子Sp1と協調して作用するという新しいメカニズムが明らかとなった。</p>			

【考察】膀胱において時計遺伝子による Cx43 の日内変動が日内排尿リズムの形成に寄与していると考えられた。これは夜尿症や夜間頻尿のような排尿リズム形成の未熟や破綻を示す病態を、時計遺伝子による膀胱機能制御という新たな視点から究明しうる可能性を示している。			
（論文審査の結果の要旨） 哺乳類は、覚醒期よりも睡眠期に尿の産生量が減り機能的膀胱容量が増大する日内リズムを有する。本研究では、概日時計と膀胱のギャップジャンクション構成蛋白コネキシン 43(Cx43)に着目し、機能的膀胱容量リズムの形成における役割を解明している。 最初に、独自に開発したマウスの排尿の経時的測定器械を用い、Cx43の発現量が野生型の約40%である <i>Cx43</i> ^{+/+} マウスは、野生型より一回排尿量が多いことを見出した。また野生型マウスでは、覚醒期よりも睡眠期にCx43の発現量は低下し一回排尿量は増大する。このリズムは恒暗条件でも保たれるが、概日時計が破綻した <i>Cry</i> -nullマウスでは完全に消失した。以上よりCx43は概日時計に制御される機能的膀胱容量の調節分子と考えられた。 次に、膀胱の時計遺伝子や Cx43 の概日リズムが内因性であることを証明した。時計遺伝子 Per2 プロモーターによりルシフェラーゼを発現するマウスから摘出した膀胱は概日リズムを刻んで発光した。また、ラット膀胱平滑筋培養細胞では時計遺伝子と Cx43 の発現およびギャップジャンクション機能に概日リズムが存在した。 さらにこの現象の機序として、時計遺伝子 Rev-erbαが別の転写因子 Sp1 と結合して Cx43 の発現を促進することを見出した。 以上の研究は、排尿日内リズムの形成機序を分子生物学的に初めて解明したものであり、夜尿症や夜間頻尿のような疾患の病態解明に今後寄与することが期待される。 したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものとみとめる。 なお、本学位授与申請者は、平成25年7月3日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日以降			